

· 研究简报 ·

化痰祛湿剂对兔膝骨性关节炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF α 的影响孟祥奇¹, 惠初华¹, 姜宏¹, 陈咏真¹, 茅彩萍², 曹莉²

(1. 苏州市中医医院, 江苏 苏州 215003; 2. 苏州大学医学院)

关键词 骨关节炎, 膝; 祛湿化痰; 细胞因子

Effect of dissipate phlegm and dehygrois on cytokine IL-1, IL-6, TNF α in knee osteoarthritis in rabbits MENGXiang-qi¹, HUI Reng-hua, JIANG Hong, CHEN Yong-zhen, MAO Cairong, CAO Li² The TCM Hospital of Suzhou, Suzhou

215003, Jiangsu, China

Key words Osteoarthritis knee Eliminat dampness resolve phlegm; Cytokines

Zhongguo Gushang / China J Orthop & Trauma 2007, 20(8); www.zggssz.com

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性关节疾病, 从关节软骨退化开始, 继而发生骨质和滑膜改变的关节疾病, 作为骨科的常见病、多发病, 在其防治方面尚无针对性的特效药物。现代医学认为, 细胞因子及生长因子、自由基等在骨性关节炎的发病中具有重要作用, 而 IL-1、IL-6 及 TNF α 是参与骨关节炎进程的重要介质^[1]。本实验采用改良 Hulth 的造模法^[2]制造兔早期膝关节炎实验性 OA 模型, 通过步态观察及检测关节肿胀度, 来观察化痰祛湿剂膝痹康对兔膝骨性关节炎的治疗作用, 并观察膝痹康对兔膝骨性关节炎血清及关节液中细胞因子 IL-1、IL-6 及 TNF α 的影响, 以探讨膝痹康治疗骨性关节炎的作用机制。

1 材料与方

1.1 药物与试剂 膝痹康由制南星、制川乌、薏苡仁、刺五加、丹参、地龙等药物组成; 我院自制成含生药 2.0 g/ml 的合剂。美洛昔康片, 扬子江药业集团有限公司生产 (批号: 05031802)。IL-1、IL-6、TNF α 放射免疫检测试剂盒, 解放军总医院科技开发中心放免所 (批号: 20050925)。

1.2 动物分组及给药 4~6 月龄健康家兔 32 只, 个体质量 2.8~3.2 kg, 雌雄各半, 苏州大学实验动物中心提供 [许可证号: SCXK(苏)2002-0008]。按随机数字表方法^[3]将 32 只家兔随机分为假手术对照组 (以下简称对照组), 模型组, 膝痹康组, 阳性药 (美洛昔康) 对照组, 每组 8 只。采用改良的 Hulth 法建立骨性关节炎动物模型^[2], 将家兔用 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 耳缘静脉麻醉, 仰卧于手术台上固定, 右膝关节局部脱毛, 备皮, 严格无菌操作, 取膝关节内侧长约 4 cm 的纵切口, 探查关节腔内无原发病变后切断内侧副韧带、前后交叉韧带; 并完整切除内侧半月板, 注意勿损伤关节软骨面, 彻底止血, 冲洗关节腔, 行抽屜试验阳性后, 逐层缝合关节囊、皮肤, 无菌敷料包扎伤处, 不予固定。术后每日肌肉注射青霉素 40 × 10⁴ U, 伤口换药, 连续 7 d 预防感染。根据临床上超疲劳活动容易提前出现 OA 的发病特点, 手术 1 周后, 每日强迫动物活动 30 min, 分 2 次驱赶, 4 周后即可获得稳定的 OA 模型。将造模成功的家兔随机分为: 模型组, 膝痹康组, 美洛昔康组,

另设对照组 (仅打开关节腔, 不损伤韧带和半月板, 缝合皮肤, 无菌敷料包扎伤处), 每组家兔 8 只。造模成功后, 治疗组给予相应药物 (膝痹康组 4 g 生药量/kg, 美洛昔康组 0.45 mg/kg) 灌胃给药, 对照组和模型组给予等量生理盐水灌胃。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 步态的评价 给药治疗 8 周, 每日观察, 第 8 周进行步态评价, 步态分级按 Codeine 的方法, 即 0 级: 正常行走; I 级: 轻微跛行, 受试下肢略有弯曲; II 级: 中度跛行, 受试下肢刚触及地面; III 级: 重度跛行, 受试下肢略离开地面, 3 足着地行走。

1.3.2 膝关节周长测量 末次给药 30 min 后, 麻醉, 用软尺测量各组动物膝关节部位周长, 同一动物手术膝关节和未手术膝关节进行自身对照, 计算肿胀率后进行统计。

$$\text{肿胀率}(\%) = \frac{\text{手术膝关节周长} - \text{正常膝关节周长}}{\text{正常膝关节周长}} \times 100\%$$

1.3.3 肉眼观察实验动物关节软骨和滑膜形态学特征 8 周后麻醉动物, 沿原切口切至关节腔, 用 0.5 ml 生理盐水冲洗, 收集关节液, 用放免法检测关节液中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的含量。切取患侧胫骨全层关节软骨及滑膜, 行大体 (肉眼) 观察。

1.3.4 血清及关节液中 IL-1、IL-6、TNF α 含量的检测 8 周后麻醉动物, 手术前颈动脉取血, 离心取血清, 用放免法检测血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的含量。

1.4 统计学处理 数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 统计软件进行统计, 两组间比较用方差分析 (ONE-WAY ANOVA) 中的最小显著差法 (LSD)。

表 1 膝痹康对实验性膝骨性关节炎家兔步态的影响 (只)

组别	动物数	0级	I级	II级	III级
对照组	8	8	0	0	0
模型组	8	0	0	2	6
膝痹康组	8	1	4	2	1
美洛昔康组	8	2	3	1	2

表 2 膝痹康对实验性膝骨性关节炎兔膝关节周长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	体质量 (kg)	正常膝关节 周长 (cm)	手术膝关节 周长 (cm)	肿胀率 (%)
对照组	8	3.15 ± 0.16	10.30 ± 0.20	10.30 ± 0.30	0
模型组	8	2.99 ± 0.28	10.65 ± 0.60	12.20 ± 0.71 ^{* *}	14.60 ± 0.60 ^{* *}
膝痹康组	8	2.80 ± 0.24	10.42 ± 0.33	11.75 ± 0.97	12.80 ± 0.55 ^{##}
美洛昔康组	8	2.99 ± 0.41	10.54 ± 0.70	11.03 ± 0.85 ^{##}	4.60 ± 0.18 ^{##}

注:与对照组比较, * * P < 0.01; 与模型组比较, ## P < 0.01

表 3 膝痹康对实验性膝骨性关节炎家兔血清和关节液中 IL-1、IL-6、TNFα 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	血清			关节液		
		IL-1 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNFα (pg/ml)	IL-1 (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	TNFα (ng/ml)
对照组	8	291.2 ± 25.7	60.5 ± 11.3	86.23 ± 22.15	2.69 ± 0.96	1.45 ± 0.59	2.08 ± 0.51
模型组	8	389.2 ± 26.1 ^{* *}	118.6 ± 17.8 ^{* *}	136.19 ± 19.85 ^{* *}	4.02 ± 0.74 ^{* *}	1.98 ± 0.61	4.32 ± 0.79 ^{* *}
膝痹康组	8	346.1 ± 30.5 [#]	90.5 ± 21.3 ^{##}	115.34 ± 25.62	3.47 ± 0.80 [#]	1.82 ± 0.73	3.55 ± 0.61 [#]
美洛昔康组	8	336.2 ± 24.7 [#]	84.2 ± 19.6 ^{##}	112.56 ± 21.36 [#]	3.25 ± 0.53 ^{##}	1.67 ± 0.56	3.21 ± 0.90 [#]

注:与对照组比较, * * P < 0.01; 与模型组比较, # P < 0.05, ## P < 0.01

2 结果

2.1 步态的评价 给药第 8 周进行步态评价, 模型组动物跛行严重, 各给药组行走步态与模型组相比有较好的改善 (见表 1)。

2.2 膝关节周长测量 结果显示对照组家兔双腿膝关节周长几乎无差别, 而模型组兔关节肿胀率则高达 14.6%。各给药组兔关节的肿胀率较模型组均低 (见表 2)。

2.3 肉眼观察实验动物关节软骨和滑膜的形态学特征 对照组: 关节软骨表面呈淡蓝白色, 光滑, 有光泽和弹性, 无裂纹及软化, 边缘规整, 触之较硬, 软骨透明, 无明显缺损和新生物质, 关节液清澈; 模型组: 关节软骨表面失去光泽, 呈灰黄色, 色泽变暗淡, 粗糙, 并有裂纹、糜烂及溃疡形成, 软骨触之较软, 透明度低, 可见边缘有细小新生物质 (骨赘) 形成和明显缺损, 部分软骨下骨质外露。滑膜存在不同程度增生、粘连, 关节液增多, 且呈泡沫状、浑浊。膝痹康组: 关节软骨外观呈淡白色, 欠光滑, 软骨触之较软, 有的可见裂纹, 滑膜轻度增生, 关节液较对照组稍多。

2.4 血清及关节液中 IL-1、IL-6、TNFα 含量的检测 用放免法测定血清及关节液中 IL-1、IL-6、TNFα 的含量。结果显示: 模型组家兔血清中 IL-1、IL-6、TNFα 和关节液中 IL-1、TNFα 的含量均较对照组明显高, 关节液中 IL-6 虽两组间无显著差异, 但也显示模型组较对照组高。膝痹康组血清中 IL-1、IL-6 及关节液中 IL-1、TNFα 的含量均较模型组明显低, 血清中 TNFα 及关节液中 IL-6 较模型组也低 (见表 3)。

3 讨论

膝骨性关节炎是一种以关节软骨退行性改变为核心, 累及骨质, 包括滑膜、关节及关节其他结构的不同程度的反复发作的慢性炎症^[4]。其发病机制尚不十分清楚。近年来发现, 在已知的细胞因子中 IL-1、IL-6、TNFα 是参与骨性关节炎发病进程的重要介质, 是炎症反应的重要调节剂, 对滑膜炎症的发展和软骨基质的破坏具有重要作用^[1]。IL-1 对关节软骨细胞代谢的干扰作用主要表现为抑制透明软骨特征性 II、IX 型胶原蛋白的合成, 促进 I、III 型胶原蛋白的合成, 而使软骨细

胞变性, 抑制软骨细胞增殖和蛋白多糖合成, 还通过促进软骨细胞合成与分泌基质金属蛋白酶 (如 MMP-1 和 MMP-3 等), 提高软骨基质中溶剂蛋白分子酶类的活性而降解关节软骨, 并能强烈抑制关节软骨的蛋白聚糖的合成。TNFα 即协同 IL-1 的作用, 又激活 IL-6 基因, 诱导 IL-6 的生成, 在骨性关节炎的发生发展中有可能起着决定性作用。Gohring^[5] 发现 IL-1、IL-6、TNFα 在软骨及滑膜中表达增高细胞因子的活性与炎症破坏及炎症反应的严重程度呈正相关。

本实验中模型组血清及关节液中 IL-1、IL-6、TNFα 较假手术组均明显高, 与相关文献一致^[1]。从实验结果看膝痹康组膝骨性关节炎兔的跛行和关节肿胀的症状较模型组轻, 软骨破坏较轻, 血清中 IL-1、IL-6、TNFα 及关节液中 IL-1、TNFα 的含量较对照组明显高, 说明化痰祛湿剂膝痹康对软骨的退变和滑膜炎症有一定抑制作用。其抑制了软骨细胞和滑膜炎症因子的释放, 增强了软骨细胞的代偿能力, 调整了软骨细胞的代谢环境, 对软骨的退变有一定缓解作用。证明了痰湿瘀阻亦是本病的基本病机之一。而膝痹康组兔的跛行和关节肿胀的症状较模型组轻, 机制可能与其显著降低膝骨性关节炎血清及关节液中相关细胞因子 IL-1、IL-6、TNFα 的含量有关。提示化痰祛湿剂对膝骨性关节炎的防治作用可能是通过抑制骨性关节炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNFα 的分泌而实现的。

参考文献

- 宋震坤, 陈文照. 环氧化酶-2 与关节炎. 中国骨伤, 2003, 16(5): 315
- 胡阿威, 张磊, 张功礼, 等. 改良 Hulth 法骨关节炎动物模型的建立. 中华医学丛刊, 2003, 3(9): 5-9.
- 方积乾, 徐勇勇, 余松林, 等. 医学统计学与电脑实验. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 446.
- 余丹丹. 骨性关节炎实验研究进展. 中医正骨, 2000, 12(12): 50
- Gohring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis lessons from animal models. Connect Tissue Res 1999, 40(1): 1-11

(收稿日期: 2006-08-07 本文编辑: 李为农)